На данный момент в лаборатории сравнительной генетики животных И01ен им. Н.И. Вавилова РАН собрано ДНК от 21 породы крупного рогатого скота, 12 пород лошадей и др.

С использованием образцов ДНК, хранящихся в банке, исследуется генетическое разнообразие пород КРС и лошадей методами микросателлитного и межмикросателлитного анализа, изучается полиморфизм генов, участвующих в формировании молочной продуктивности (гены каппа-казеина, пролактина, гормона роста) и устойчивости КРС к лейкозу (ген иммунного ответа - BoLA-DRB3). На основе полученных данных созданы ДНК-диагностикумы для тестирования генетического потенциала КРС:

• на устойчивость к лейкозу,

• на качество молока в связи с его пригодностью для сыроделия,

• на жирность и белковомолочность.

Созданные ДНК-диагностикумы позволяют проводить раннюю диагностику и отбор животных с желательными генотипами. В лаборатории создана также специализированная компьютерная база данных «Cow», включающая сведения о генофондах редких и исчезающих пород крупного рогатого скота (7 пород), а также о генотипах индивидуальных животных (1327 животных) по генам хозяйственно-полезных признаков и резистентности к заболеваниям, охарактеризованных с использованием 12 ДНК-маркерных систем. Программное обеспечение базы данных позволяет проводить системный поиск и статистическую обработку данных.

Н.П. Глинских, А.К. Штукатуров, И.А. Новикова, А.А. Бахарев, П.В. Устьянцев, И.В. Устьянцев

(ФГУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора)

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОРАЖЕНИЙ КОЖНЫХ И СЛИЗИСТЫХ ПОКРОВОВ

Начало использованию клеточных культур в клинической практике положено в 1986 году Грином, который показал, что применение диплоидных клеточных культур резко ускоряет заживление ран у мышей.

В настоящее время клеточные культуры достаточно широко используются в ряде стран - Великобритании, Канаде, США, ряде Европейских стран, Японии, в основном для лечения поверхностных поражений кожи и слизистых покровов, особенно при лечении тяжелых ожогов, трофических язв и др. Культивируемые клетки как самостоятельные агенты, так и в комплексе с элементами клеточного матрикса, приводят к ускорению и качественно лучшему заживлению ран.

Установлено, что аллофибробласты (АФБ) способны синтезировать множество полипептидных факторов роста. Один из них, обозначаемый как ТГФ (трансформирующий фактор роста), представляет собой полипептид, который, подобно фактору роста эпидермиса, способствует пролиферации и миграции кератиноцитов. ТГФ можно рассматривать как аутокринный фактор роста, который стимулирует рост тех же клеток, которые его секретируют. Принимая во внимание многочисленность полипептидов, которые секретируются АФБ, можно предположить, что среди них есть и другие факторы, обладающие аутокринным действием, Роль культивируемых аллотрансплантатов в заживлении хронических язв, видимо, заключается в следующем. В глубине язвенной ниши могут оставаться группы клеток, относящиеся к волосяным фолликулам или потовым железам. Поскольку условия на поверхности язвы неблагоприятны для миграции и пролиферации кератиноцитов, они не покрывают рану, но и не погибают. При достаточной стимуляции аутокринными факторами роста эндогенные кератиноциты начинают размножаться и мигрировать. Использование культивированных фибробластов для закрытия раневых поверхностей сразу же показало ряд существенных преимуществ этого метода: получение фибробластов в культуре не требует дорогостоящих пита-

тельных сред, стимуляторов роста, что более чем в 20 раз снижает стоимость клеток; фибробласты легко поддаются пассированию, при котором они частично утрачивают поверхностные антигены гистосовместимости; применение культуры фибробластов открывает возможность использования для изготовления трансплантатов аллоклеток и создания клеточных банков; сокращаются сроки получения трансплантантов, готовых к использованию в клинике с 3–4 недель до 2–3 суток; приживление трансплантата из фибробластов до 97%.

Исходя из уже имеющегося в России, в ЕНИИВИ, в частности, опыта был создан и охарактеризован банк диплоидных аллофибробластов для использования их в лечебной практике.

Для этого были решены следующие задачи:

1. Отобрана из имеющихся в коллекции банка-музея и охрактеризована согласно требований ВОЗ и ВСКК линия диплоидных клеток фибробластов человека.

2. Отработаны условия транспортировки и хранения АФБ.

3. Проведены доклинические и клинические исследования.

4. На основе полученных данных совместно с практическими врачами разработаны схема и алгоритмы применения аллофибробластов на практике.

Для решения первой задачи был проведен скрининг имеющихся в коллекции линий диплоидных фибробластов, в результате чего была выбрана культура, соответствующая существующим требованиям.

Культура прошла кариологические исследования по стандартным методикам, а также тесты на соответствие видовой принадлежности. Проведен анализ на отсутствие посторонних вирусов и других контаминантов. Отсутствие ВИЧ, вирусов гепатита, аденовирусов, хламидий и микоплазм подтверждено в ПЦР, других микроорганизмов – микробиологическими тестами. Отсутствие других вирусов-контаминантов в реакции гемадсорбции эритроцитов и совместным культивированием с клетками обезьяны.

Исследования по применению АФБ для лечения ожогов на животных показали, что заживление ожоговых поражений происходит в 1,5–2,5 раза быстрее, чем в группе, получающей стандартное лечение.

Также изучено воздействие клеток культивированных диплоидных фибробластов человека на течение экспериментального парадонтита у крыс. Наблюдения проводили при использовании 2 схем лечения: 1 — с использованием остеопластического материала, 2 — с использованием остеопластического материала с фибробластами человека. Контрольная группа была оставлена без лечения.

Показано, что время восстановления повреждений кости при использовании композиции с фибробластами сократилось в 2–3 раза, по сравнению с первым вариантом. В контроле восстановления кости не происходило.

Гистологические исследования, проведенные в ходе эксперимента, показали, что в поврежденных участках в равной степени восстанавливались как элементы соединительной, так и костной ткани.

Наиболее вероятным путем воздействия культивированных малодифференцированных клеток на восстановление различных тканей является выделение факторов роста, стимулирующих рост собственных клеток организма, так как межвидовой барьер делает маловероятным приживление клеток человека в организме крысы.

Использовали обычно 3–4-суточную культуру АФБ на 5–20 пассаже в виде взвеси клеток в концентрации 100–120 тыс. кл/мл.

Взвесь АФБ, либо АФБ трансплантированные на покрытие «Фолидерм», в питательной среде без сыворотки в течение часа доставляли из лаборатории в отделение, где производилась подготовка к трансплантации. Оценку готовности раны производили визуально и бактериологически. АФБ наносились на раны в соотношении 30–50 тыс. клеток на 1 кв. см или в виде монослоя клеток на «Фолидерме».

Результаты использования этого метода для лечения глубоких ожогов у людей таковы: в 96,4% случаев отмечен положительный результат. На 3 сутки после трансплантации отмечалось начало краевой эпителизации ячеек сетчатого трансплантата, грануляционная ткань в ячейках покрывалась тонкой пленкой фибрина, по краю которой происходила дальнейшая эпителизация. Полная эпителизация ячеек сетчатого трансплантата происходила на 7–8 сутки.

При лечении заболеваний парадонта выбор материала для трансплантации, проводили с учетом ряда факторов, каждый из которых следует рассматривать с позиции пригодности для остеопласти-

ки: остеоиндуктивный потенциал, доступность получения материала, безопасность, биологическая совместимость, иммунологическое соответствие, скорость васкуляризации (Edward S, Cohen, 1994).

Разнообразие и многочисленность пластических материалов, используемых для восстановления костной ткани при заболеваниях пародонта, в значительной степени говорит скорее об их недостатках, чем о положительных свойствах.

О положительном эффекте лечения пародонтита с использованием культуры аллофибробластов, полученной из дермы плодов человека, недавно заявили отечественные исследователи (В.П. Туманов с соавт., 1998 г.). Данными авторами был разработан новый способ лечения воспалительно-деструктивной формы пародонтита с использованием культуры аллофибробластов человека, заселенных на твердую мозговую оболочку.

В своей диссертационной работе «Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта» ГС. Рунова на основании полученных экспериментальных данных убедительно показала эффективность разработанного оригинального метода лечения хронического пародонтита при использовании культивированных аллофибробластов и твердой мозговой оболочки.

Около двух лет в некоторых стоматологических клиниках был использован аллогенный материал - АФБ, культивированные на гранулах коллапана. Препарат, состоящий из коллапана и АФБ по данным клинического наблюдения обладает значительно более выраженным остеоиндуктивным потенциалом, чем при использовании их по отдельности или других остеопластических препаратов. Об этом свидетельствуют клинические данные, а также нарастание уровня плотности и высоты костной ткани по данным рентгенографии и остеоденситометрии. Этот комплекс интересен как наличием в нем живой тканевой клетки, так и присутствием коллагеновых волокон в грануле коллапана. Коллаген является одним из основных фибриллярных белков соединительной ткани. Большая часть коллагена обнаруживается в составе коллагеновых волокон, составляющих основу соединительной ткани пародонта.

Этот комплекс использован при хирургических вмешательствах на пародонте у 38 пациентов с тяжелыми формами пародонтита: глубиной костных дефектов более 10 мм, 1-2 стенным или кольцеобразным разрушением кости. На протяжение всего периода применения и наблюдения пациентов, у которых использовали АФБ, мы не отмечали отрицательных результатов, каких-либо осложнений и нежелательной тканевой реакции. Положительные клинические результаты сопровождались улучшением состояния слизистой оболочки альвеолярного отростка, его плотного сращения с тканями зуба, уменьшением или исчезновением подвижности зубов.

Таким образом, опыт использования АФБ для лечения глубоких ожогов и заболеваний пародонта показал перспективность широкого внедрения в клеточных культур в лечебную практику.

УДК 87.270715

Н.В. Шишова, А.И. Абилов, Э.Н. Гахова, Г.Ю. Максудов

(Институт биофизики клетки РАН, Всероссийский государственный НИИ животноводства, Московский зоопарк)

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭПИДИДИМАЛЬНОГО СЕМЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *POST MORTEM* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИОБАНКОВ

Создание криоколлекций генетического материала редких видов - один из перспективных способов сохранения биоразнообразия. Однако получение генетического материала от животных в природе сложно и дорого. В то же время существует малоиспользуемый резерв генетического материала ценных животных. Это половые